

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 15/53, 9/02, C12P 7/64, A01H 5/00, C12N 15/82	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/60093 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Oktober 2000 (12.10.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/02545 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. März 2000 (22.03.00) (30) Prioritätsdaten: 199 14 464.8 30. März 1999 (30.03.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR PFLANZENBIOCHEMIE IPB [DE/DE]; Weinberg 3, D-06018 Halle (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FEUSSNER, Ivo [DE/DE]; Institut für Pflanzenbiochemie IPB, Weinberg 3, D-06120 Halle (DE). HORNUNG, Ellen [DE/DE]; Institut für Pflanzenbiochemie IPB, Weinberg 3, D-06120 Halle (DE). (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: LINOLEATE AND LINOLENATE-LIPOXYGENASE MUTANTS (54) Bezeichnung: LINOLEAT- UND LINOLENAT-LIPOXYGENASE-MUTANTEN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for producing plant lipoxxygenases with modified position specificity, to the lipoxxygenases obtained using this method and to the use of said lipoxxygenases for hydroperoxylating substrates. In particular, the inventive LOXs provide the first means of producing novel γ-linolenic acid derivatives on a large scale. To this end, γ-linolenic acid is incubated with the inventive LOXs in suitable conditions as a substrate. The γ-linolenic acid is then hydroperoxylated according to the LOXs mutants used, preferably in position 6 or position 9 or positions 6 and 9.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen von pflanzlichen Lipoxxygenasen mit veränderter Positionsspezifität sowie die durch das Verfahren erhaltene Lipoxxygenase und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Substraten. Insbesondere erlauben die erfindungsgemässen LOXs erstmalig das Herstellen neuer γ-Linolensäure-Derivate in grossem Massstab. Hierzu wird γ-Linolensäure als Substrat mit den erfindungsgemässen LOXs unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Je nach eingesetzter LOXs-Mutante erfolgt dann eine Hydroperoxylierung der γ-Linolensäure, vorzugsweise an Position 6 bzw. Position 9 bzw. Position 6 und 9.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

LINOLEAT- und LINOLENAT-LIPOXYGENASE-MUTANTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Herstellen von pflanzlichen Lipoxygenasen mit veränderter Positionsspezifität sowie die durch das Verfahren erhaltene Lipoxygenase und deren Verwendung zur Hydroperoxylierung von Substraten.

Die LOXs (Linolensäure: Sauerstoff-Oxidoreduktase; EC.1.13.11.12; LOXs) sind im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet (Siedow, J.N. (1991) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42, 145-188; Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131). Diese Enzyme stellen eine Familie aus eisenhaltigen Dioxygenasen dar, die eine bereichs- (oder positions-) und stereoselektive Oxygenierung von Polyenfettsäuren zu Hydroperoxyderivaten katalysieren (Rosahl, S. (1996) *Z. Naturforsch.* 51c, 123-138). In Säugern werden LOXs nach ihrer Spezifität für bestimmte Positionen bei der Arachidonsäureoxygenierung klassifiziert (Yamamoto, S. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* 1128, 117-131; Schewe, T., Rapaport, S.M. & Kühn, H. (1986) *Adv. Enzymol. Mol. Biol.* 58, 191-272). Da Arachidonsäure in höheren Pflanzen nicht vorkommt oder nur in geringen Mengen als Bestandteil von Speicherlipiden, werden LOXs aus Pflanzen als 9- und 13-LOXs klassifiziert. Diese Nomenklatur leitet sich von der Position ab, an der in Linolsäure (LA) die Oxygenierung erfolgt (Gardner, H.W. (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1084, 221-239). In jüngster Zeit ist eine umfangreichere Klassifizierung pflanzlicher LOXs auf der Grundlage eines Vergleichs der Primärstrukturen vorgeschlagen worden (Shibata, D. & Axelrod, B. (1995) *J. Lipid Mediators Cell Signal.* 12, 213-228). Die Spezifität einer LOX für eine bestimmte Position ist das Ergebnis zweier katalytischer Teilreaktionen:

(i)

der bereichs- und stereospezifischen Entfernung von Wasserstoff, wobei bei Fettsäuren, die mehrere Doppelbindungen enthalten (wie Linolensäure, Arachidonsäure oder Eikosapentaensäure), die Wasserstoffentfernung an verschiedenen Positionen erfolgen kann;

(ii)

der bereichs- und stereospezifischen Sauerstoff-Insertion (wobei der Sauerstoff an verschiedenen Positionen (der +2 oder -2 Position) eingefügt werden kann (Vergleich Figur 1). Somit kann eine Fettsäure mit 3 doppelallylischen Methylenen, wie Arachidonsäure, von einer LOX zu 6 regioisomeren Hydroperoxyderivaten (HPETEs) oxigeniert werden, nämlich zu 15- und 11-HPETE (diese stammen aus der Entfernung von Wasserstoff an Position C-13), 12- und 8-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-10) und 9- und 5-HPETE (diese stammen aus der Wasserstoffentfernung an Position C-7). Experimente mit 12- und 15-LOX aus Säugern zeigten, daß die Position der Wasserstoffentfernung verändert werden kann, wenn kritische Aminosäuren durch gerichtete Mutagenese verändert werden (Borngräber, S., Kuban, R. J., Anton, M. & Kühn, H. (1996) J. Mol. Biol. 264, 1145-1153; Sloane, D.L., Leung, R., Craik, C. S. & Sigal, E (1991) Nature 354, 149-152). Versuche zum Ändern der LOX-Reaktivität von einer +2 nach -2-Umlagerung oder umgekehrt (z. B. Umwandeln einer Linoleat-13-LOX zu einer 9-LOXs) mit Hilfe gerichteter Mutagenese waren bisher nicht erfolgreich.

Der vorliegenden Erfindung lag das technische Problem zugrunde, ein Verfahren anzugeben, mit dem LOXs gewünschter Positionsspezifität bereitgestellt werden können.

Dieses Problem wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren, bei dem eine oder mehrere Aminosäuren in einer Wildtyp-LOX ausgetauscht werden.

Figur 1 zeigt die Spezifität einer LOX-Reaktion mit Substraten, die zwei allylische Methylenen enthalten.

Figur 2 zeigt die direkte und inverse Orientierung des Substrats im aktiven Zentrum von LOXs.

Figur 3 zeigt ein Modell der Enzymsubstratwechselwirkung der Wildtyp-LOX aus Gurke und der Mutante H608V (entspricht H597V, wobei bei letzterer Nomenklatur die Numerierung gemäß der Sequenz aus Figur 5 angewendet wird).

Figur 4 zeigt die HPLC-Analyse von Hydroxyfettsäuren, die mit Hilfe der Wildtyp-LOX aus Gurke und der H597V-Mutante aus LA erhalten werden.

Figur 5 zeigt die Sequenz der Wildtyp-LOX aus *Cucumis sativus*.

Figur 6 zeigt die HPLC-Analyse von Hydroxyfettsäuren, die mit Hilfe der Mutante V531F aus γ -Linolensäure erhalten werden.

Figur 7 zeigt die HPLC-Analyse von oxidiertem Trilinolein, gebildet mit Wildtyp-Enzym und H597V Mutante.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch der Aminosäuren im Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 bzw. 593 bis 602 der LOX aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer LOX aus einer anderen Pflanzenart. Die oben angegebenen Aminosäurepositionen beziehen sich auf die Sequenz unter der Zugangsnummer X92890 in der NIH-Datenbank „Entrez“ bzw. der Sequenz gemäß Figur 5. Die zu den Aminosäurepositionen 527 bis 536 bzw. 593 bis 602 der Lipxygenase aus *Cucumis sativus* korrespondierenden Positionen in LOXs aus anderen Pflanzenarten können durch Sequenzvergleiche zwischen der Sequenz X92890 und den weiteren Proteinsequenzen wie aus Sojabohnen, Kartoffel, Arabidopsis, Tabak oder Gerste leicht ermittelt werden. Die folgende Tabelle 1 zeigt das Ergebnis eines Aminosäurevergleichs zwischen dem aus Gurken stammenden Enzym und den korrespondierenden Positionen in den Enzymen aus anderen Pflanzen. Die erste Gruppe (13-LOX) zeigt einen Vergleich zwischen LOXs, die an Position 13 eine Hydroperoxy-Gruppe einführen, während die zweite Gruppe (9-LOX) einen Vergleich zwischen Sequenzen zeigt, die an Position 9 einen Hydroperoxy-Rest einführen.

Tabelle 1

Vergleich der Aminosäurereste, die vermutlich an der Spezifität einer pflanzlichen LOX für eine bestimmte Position (13 bzw. 9) beteiligt sind.

ENZYME Rest	Zugangs-Nr.	Position d. AS-Restes	AS-
13-LOX			
Gurke-Lipid-Körper LOX	X92890	596/597	Thr/His
LOX-1 aus Sojabohnensamen	P08170	556/557	Thr/Phe
LOX-H1 aus Kartoffeln	X96405	614/615	Ser/Phe
LOX-2 aus <i>Arabidopsis</i>	P38418	611/612	Cys/Phe
9-LOX			
LOX aus Kartoffel	P37831	579/580	Thr/Val
Elicitor-induzierte LOX aus <i>Tabak</i>	X84040	580/581	Thr/Val
LOX-A aus Gerstenkorn	L35931	574/575	Thr/Val

Das Sequenzmotiv bei Position 527 bis 536 lautet TVNDVGYHQL gemäß dem Einbuchstabencode für Aminosäuren in der hinterlegten Sequenz X92890. Das Sequenzmotiv bei Position 593 bis 602 lautet IETTHYPSKY (Sequenz gemäß X92890).

Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform erfolgt der Austausch an Position 531 und/oder 597 der Sequenz X92890. An Position 531 befindet sich im Wildtyp ein Val-Rest und an Position 597 ein His-Rest.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Rest an Position 531 durch einen Phe- oder His-Rest und an Position 597 durch einen Val- oder Phe-Rest ersetzt.

Ganz besonders bevorzugt ist eine Ausführungsform bei der der Austausch an Position 531 einen Val- → Phe- und an Position 597 einen His- → Val-Austausch darstellt. Vorzugsweise wird jeweils nur einer der genannten Austausche in einem vorgegebenen Wildtyp durchgeführt. Dabei führt der Austausch in dem Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 dazu, daß die 13-LOX aus dem Lipidkörper von *Cucumis sativus* in eine γ -Linolensäure 6-LOX umgewandelt wird, während der Austausch an Position 597 zu einer Umwandlung der Linolsäure 13-LOX in eine Linolsäure 9-LOX führt. Im folgenden werden diese beiden Mutanten auch als V531F und H597V bezeichnet. Die Wildtypsequenz ist als Figur 5 gezeigt. Die Positionen 531 und 597 sind markiert.

Vorzugsweise erfolgt der Austausch der Aminosäuren in dem Wildtyp mit Hilfe der gerichteten Mutagenese, wie sie im Stand der Technik hinlänglich bekannt ist (vgl. z. B. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin LOX-mutanten, die nach den oben beschriebenen Verfahren erhältlich sind. Bevorzugte Mutanten sind die V531F und H597V, wie oben näher erläutert. Die erfindungsgemäßen LOXs lassen sich mit Hilfe der aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren, wie der gerichteten Mutagenese, und der anschließenden Proteinexpression herstellen.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner Nukleinsäuren, die für die erfindungsgemäßen LOXs kodieren. Ausgehend von den im Stand der Technik verfügbaren Wildtypsequenzen, lassen sich die erfindungsgemäßen Sequenzen durch gerichtete Mutagenese herstellen.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren, in die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren zum Zwecke der Klonierung und Expression eingebracht werden. Entsprechende Klonierungs- und Expressionsvektoren sind dem Fachmann aus dem Stand der Technik hinlänglich bekannt (vgl. Maniatis et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine Zelle, in die die erfindungsgemäße Nukleinsäure oder der erfindungsgemäße Vektor eingebracht werden. Nach Einbringen der Nukleinsäure bzw. des Vektors ist die Zelle dann in der Lage, eine LOX erstmalig oder in verstärktem Maße zu exprimieren. Auf diese Weise kann das Fettsäuremuster einer Zelle gezielt verändert werden mit dem Ergebnis, daß der Phänotyp der Zelle in verschiedener Hinsicht verändert werden kann. Hierzu zählt u. a. eine andere Zusammensetzung der Zellmembran.

Schließlich können durch *in vitro* -Kultivierungsverfahren aus den o. g. Zellen neue Pflanzen bzw. Pflanzenteile regeneriert werden. Zum Herstellen solcher transgener Pflanzen kann beispielsweise das bekannte Transformationssystem auf der Basis von *Agrobakterien* und Ti-Plasmid-Derivaten eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen LOXs erlauben erstmalig das Herstellen neuer γ -Linolensäure-Derivate in großem Maßstab. Hierzu wird γ -Linolensäure als Substrat mit den erfindungsgemäßen LOXs unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Je nach eingesetzter LOX-mutante erfolgt dann eine Hydroperoxylierung der γ -Linolensäure vorzugsweise an Position 6 bzw. Position 9 bzw. Position 6 und 9.

Besonders bevorzugt ist ein γ -Linolensäure-Derivat, das eine Hydroperoxygruppe an Position 6 enthält. Das Derivat kann dann einfach in das Hydroxyderivat überführt werden.

Ein solches γ -Linolensäurederivat war bisher nicht zugänglich, da es an einer LOX mit geeigneter Positionsspezifität fehlte.

Die weiteren Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung.

1. Herstellen der Mutante H597V

Materialien:

Die verwendeten Chemikalien wurden aus den folgenden Quellen bezogen: die Standards für chirale und racemische Hydroxyfettsäuren wurden von Chayman Chem (Ann Arbor, Mi, USA) und Trilinolein (TL) von Sigma, Deisenhofen, (Deutschland) bezogen. Methanol, Hexan, 2-Propanol (allesamt HPLC-Grad) wurden von Baker (Griesheim, Deutschland) bezogen. Restriktionsenzyme wurden von New England BioLabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen.

Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Für die bakterielle Expression der Wildtyp-LOX und der LOX-Mutante und für die gerichtete Mutagenese wurde das Plasmid pQE-30 (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet, das die cDNA der LOX aus Lipidkörpern von Gurkenkotyledonen als Insert enthielt (LOXpQE 30; vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436). Die Mutagenese wurde mit Hilfe des QuikChange-Mutagenese-Kits von Stratagene (Heidelberg, Deutschland), durchgeführt. Oligonukleotide mit den geeigneten Basenaustauschen wurden von MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Zur Analyse der Mutationen wurden weitere konservative Basenaustausche eingeführt, um neue Restriktionsspaltstellen zu erzeugen oder bestehende zu deletieren. Weiterhin wurden sämtliche Mutationen sequenziert, und mindestens drei verschiedene Bakterienklone wurden exprimiert und für die Untersuchung der enzymatischen Eigenschaften eingesetzt. Die Expression von LOX-pQE-30 und sämtlicher Mutanten wurde gemäß Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436, durchgeführt. Zellen aus 1-Liter-Kulturen wurden in 5 bis 7 ml Lysis-buffer resuspendiert und mit Hilfe einer Ultraschallspitze mit Pulsen für jeweils 30 Sekunden aufgebrochen, und die Zelltrümmer wurden pelletiert. Die Affinitätsaufreinigung der polyHis-verlängerten LOX wurde wie

zuvor beschrieben durchgeführt (vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436).

Aktivitätsassay und Probenaufbereitung:

Für die Produktanalyse wurden 0,9 ml der Zell-Lysate mit 0,9 mM LA, 0,9 mM γ -Linolensäure oder 1,2 mM Trilinolein (Endkonzentration) in 100 mM Tris-Puffer pH 7,5 für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktionen wurden abgestoppt durch den Zusatz von Natriumborhydrid, um die gebildeten Hydroperoxyfettsäuren zu den entsprechenden Hydroxyverbindungen umzuwandeln. Die Proben wurden auf pH 3 angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert (vgl. Bligh, E.G. & Dyer, W. J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917). Die untere Chloroformphase wurde wiedergewonnen und das Lösungsmittel abgedampft. Das verbleibende Lipid wurde mit 0,1 ml Methanol gelöst und Aliquots wurden der HPLC-Analyse unterzogen. Für die alkalische Hydrolyse der Triacylglycerine wurden die Lipidextrakte mit 0,4 ml Methanol verdünnt. Es wurden 80 μ l 40 % (w/v) KOH zugesetzt, und die Proben wurden unter Argonatmosphäre für 20 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Eisessig angesäuert, und die Aliquots wurden durch RP-HPLC analysiert.

Analyse:

Die HPLC-Analyse wurde mit einem Hewlett Packard 1100 HPLC System, gekoppelt an einen Diodendetektor, durchgeführt. Die RP-HPLC der freien Fettsäurederivate wurde auf einer Nucleosil C-18 Säule (Macherey-Nagel, 250 x 4 mm, 5 μ m Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Methanol/Wasser/Essigsäure (85/15/0.1; v/v/v) und einer Flußrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Absorption bei 234 nm (Absorption des konjugierten Diensystems der Hydroxyfettsäuren) und bei 210 nm (Polyenfettsäuren) wurden entsprechend aufgezeichnet. Triacylglycerine, die oxygenierte LA enthielten, wurden auf einer Nukleosil C-18 Säule (Macherey-Nagel, Düren,

Deutschland; 250 x 4 mm, 5µm Partikelgröße) unter Verwendung eines binären Gradientensystems aufgetrennt. Das System umfaßte als Lösungsmittel A: Methanol/Wasser/Essigsäure (90/10/0,1; v/v/v) und als Lösungsmittel B: Methanol/Essigsäure (100/0,1, v/v), und das folgende Gradientenprogramm wurde durchlaufen: 10 min bei 100 % Lösungsmittel A, dann über 20 min mit einer linearen Zunahme an Lösungsmittel B auf 100 % Lösungsmittel B, gefolgt von einem isokratischen Lauf von 50 min bei 100 % B. Die Absorption bei 234 nm wurde aufgezeichnet. Die Direktphasen-HPLC (SP-HPLC) von Hydroxyfettsäurenisomeren wurde auf einer Zorbax SIL Säule (HP, Waldbronn, Deutschland; 250 x 4,6 mm, 5 µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus n-Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/2/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1ml/min durchgeführt. Die Enantiomer-Zusammensetzung der Hydroxyfettsäuren wurde analysiert mit Hilfe von Chiral-Phasen-HPLC auf einer Chiralcel-OD-Säule (Daicel Chem. Industrie, vertrieben von Baker Chem., Deventer, Niederlande; 250 x 4,6 mm, 5µm Partikelgröße) mit einem Lösungsmittelsystem aus Hexan/2-Propanol/Essigsäure (100/5/0,1, v/v/v) in einer Flußrate von 1 ml/min. (vgl. Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kühn, H. & Wasternack, C. (1997) J. Biol. Chem. 272, 21635-21641).

Modellieren der Enzym-/Substratwechselwirkung durch Veränderung der Struktur mit Hilfe gerichteter Mutagenese:

Die durchgeführten Strukturuntersuchungen an zahlreichen Lipoxygenasen verschiedener Quellen und die eigenen Untersuchungen ergaben, daß Position 597, die einen His-Rest in der Lipoxygenase aus dem Lipidkörper der Gurke trägt, ein geeigneter Angriffspunkt sein könnte zum Verändern der Positionsspezifität der 13-LOX. So wurde die Mutante H597V mit Hilfe gerichteter Mutagenese hergestellt. Der Wildtyp und die Mutante wurden überexprimiert als polyHIS-verlängerte Fusionsproteine auf einer Nickelsepharose-Säule gereinigt. Wie erwartet, ergab die HPLC-Analyse des oxygenierten LA-Produkts mit dem Wildtyp-Enzym als Hauptprodukt 13-H(P)ODE (vgl. Figur 4). Für die Mutante H597V wurde jedoch 9-H(P)ODE als Hauptprodukt identifiziert. Es wurde eine weitere Mutante hergestellt, bei der der His-Rest

an Position 597 durch einen weiteren Aminosäurerest ersetzt worden ist, wobei der weitere Aminosäurerest ein größeres Volumen als Valin aber ein kleineres Volumen als Histidin ausfüllt. Es wurde die Mutante H597M hergestellt. Auch diese Mutante zeigte eine starke Bevorzugung der 9-H(P)ODE-Bildung. Die kinetische Charakterisierung der 13-LOX gemäß Wildtyp und der 9-LOX Mutante H597M zeigte, daß die Mutation zu einer stark erhöhten Substrataffinität und einer Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit führte. Für das Wildtyp-Enzym wurde eine K_M von 114.9 μM und ein LA Umsatz unter V_{\max} Bedingung (Substratsättigung) von 12 s^{-1} ermittelt (23 Punkte wurden gemessen zwischen 100 μM und 250 μM LA Konzentration). Im Gegensatz dazu wurde eine V_{\max} von 2 s^{-1} und eine K_M von 1.333,3 μM für die H597M Mutante berechnet (21 Punkte wurden zwischen 300 μM und 1.400 μM LA Konzentration gemessen). Diese Daten zeigen, daß die Substratbindung durch die Mutante energetisch behindert sein könnte, so daß mehr Substrat erforderlich ist, um V_{\max} zu erreichen. Es wurde eine weitere Mutation untersucht, indem eine Mutante hergestellt wurde, in der das polare Threonin an Position 596 ausgetauscht wurde durch ein Isoleucin, das kleiner ist, aber keine polare Hydroxygruppe enthält. Diese Mutante war katalytisch aktiv (vergleichbar mit dem Wildtyp-Enzym), zeigte jedoch eine zufällig verteilte Positionsspezifität.

Spezifität der Reaktion mit Trilinolein:

Frühere Untersuchungen der Substratspezifität mit LOX aus den Lipidkörpern der Gurke zeigten die Fähigkeit des Enzyms, veresterte Polyenfettsäuren zu oxygenieren (vgl. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M. & Kindl, H. (1998) FEBS Lett. 431, 433-436; Feussner, I., Balkenhohl, T.J., Porzel, A., Kühn, H. & Wasternack, C. (1997) J. Biol. Chem. 272, 21635-21641). Da Triacylglycerine keine freien Carboxylgruppen enthalten, wurden keine wesentlichen Unterschiede erwartet, wenn das Muster der Oxygenierungsprodukte des Wildtyps mit der 9-LOX Mutante verglichen wird. In der Tat wurde gefunden, daß das Wildtyp-Enzym und die 9-LOX Mutanten eine Trilinoleat-13-LOX-Aktivität zeigten. Jedoch waren die Raten der Trilinolein Oxygenierung durch die 9-LOX Mutanten nur 50 % der Aktivität, wie sie für das Wildtyp-Enzym ge-

messen wurde. Weiterhin führte die Trilinolein-Oxygenierung durch die mutierten Enzyme im wesentlichen zu Triacyglyzerinvarianten, in denen ein LA Rest oxygeniert war. Im Gegensatz dazu wurden mit dem Wildtyp-Enzym alle 3 Linolsäurereste oxygeniert (vgl. Figur 7).

2. Herstellen der LOX-Mutante:

Die für die Herstellung dieser Mutante verwendeten Reagenzien und Verfahren waren im wesentlichen wie bereits oben für die H597V Mutante beschrieben. Im folgenden werden einige Abwandlungen der o. g. Verfahren, die speziell an die Herstellung der V531F Mutante angepaßt waren, erläutert.

Gerichtete Mutagenese und Proteinexpression:

Die Ausgangs-cDNA und der Mutagenese-kit waren wie oben beschrieben. Zur Analyse der Mutation wurden weitere konservative Basenaustausche durchgeführt, um eine neue Restriktionsspaltstelle für *BstEII* zu erzeugen. Für die Herstellung der Mutation V531F wurden die folgenden Primer verwendet: GCT TAT GTA ACT GTT AAT GAT TTC GGT TAC CAT CAA CTT ATT AGT CAT TGG TTG CAT AC (kodierender Strang) und GTA TGC AAC CAA TGA CTA ATA AGT TGA TGG TAA CCG AAA TCA TTA ACA GTT ACA TAA (komplementärer Strang). Weiterhin wurde die Mutante sequenziert und 3 verschiedene Bakterienkolonien wurden exprimiert und für die enzymatischen Untersuchungen verwendet. Die Expression von LOXpQE-30 wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt. Auch die weitere Aufbereitung erfolgte wie bereits oben angegeben. Auch die Analyse des erzeugten Fettsäurederivats (das eine Hydroperoxygruppe in 6 Position enthält), erfolgte wie oben angegeben. Das Ergebnis der SP-HPLC Analyse der Umsetzung von γ -Linolensäure mit V531F ist in Figur 6 gezeigt. Die folgende Tabelle 2 zeigt einen Vergleich der Spezifität des Wildtyps (cslbLOX) mit der Mutante (cslbLOX_{V531F}).

Tabelle 2

Vergleich der Produktspezifität von cslbLOX und cslbLOXV₅₃₁F mit γ -Linolensäure

Enzym	(13S, 11E, 9Z, 6Z)- 18:2	(10S, 12Z, 8E, 6Z) -18:2	(9S, 12Z, 10E, 6Z) -18:2	(6S, 12Z, 9Z, 7E)- 18:2
cslbLOX	80 %	17 %	3 %	0 %
cslbLOXV ₅₃₁ F	26 %	14 %	9 %	51 %

3. Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt, daß die Positionsspezifität der LOX-Reaktion von dem Ort der Wasserstoffabspaltung und von der Orientierung des Radikals abhängt. Die [+2]-Radikalanordnung zeigt, daß der Sauerstoff an dem zweiten Kohlenstoffatom in Richtung des Methylterminus des Substrats, gezählt von der Stelle der Wasserstoffentfernung, eingeführt wird. [-2] zeigt die inverse Orientierung der Radikalanordnung.

Figur 2 zeigt die direkte und inverse Substratorientierung an der aktiven Stelle der LOX (abgewandelt von Gardner, H. W. (1989) Biochim. Biophys. Acta 1001, 274-281).

Figur 3 zeigt ein 3-dimensionales Model der Enzymsubstratwechselwirkung. In der linken Abbildung ist das Wildtyp-Enzym gezeigt. Hier tritt der Methylterminus des Fettsäuresubstrats in Kontakt mit der Seitenkette H608. Der geladene Rest R758 wird durch den Rest H608 abgeschirmt. In der rechten Abbildung wird die Mutante H608V (\cong H597V) gezeigt. Bei der inversen Orientierung kann die negativ geladene Carboxylgruppe des Substrats eine Salzbrücke mit dem positiv geladenen Stickstoff von R758 ausbilden.

Figur 4 zeigt die HPLC-Analyse von Fettsäuren mit der Mutante H597V. Gleiche Mengen an LOX-Protein wurden mit 0,9 mM LA bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Nach Reduktion der Lipide mit Natriumborhydrid wurde die Reaktionsmischung auf pH 3 mit Essigsäure angesäuert, und die Lipide wurden extrahiert. Die oxygenierten Fettsäurederivate wurden mittels RP-HPLC isoliert, und die einzelnen Positionsisomere wurden mit Hilfe der SP-HPLC analysiert. Die Verhältnisse von S und R wurden mit Hilfe der CP-HPLC analysiert (eingesetzte Abbildungen).

Figur 5 zeigt die Aminosäuresequenz der Wildtyp-Lipoxygenase aus *Cucumis sativus*.

Figur 6 zeigt die HPLC-Analyse des Hydroxyfettsäuremusters wie es mit der Mutante V531F und γ -Linolensäure erhalten wird.

Figur 7 zeigt die HPLC-Analyse von oxidiertem Trilinolein als Ergebnis der Umsetzung mit dem Wildtyp-Enzym bzw. der Mutante H597V. Gleiche Mengen an LOX-Protein wurden mit einer Emulsion aus 1,2 mM TL für 30 Minuten inkubiert. Die Lipide wurden mit Natriumborhydrid reduziert, und die Reaktionsmischung wurde mit Eisessig auf pH 3 angesäuert. Nach der Extraktion der Lipide erfolgte die Analyse mittels RP-HPLC. Ein repräsentatives Chromatogramm dieser Analyse ist gezeigt. Die Zahlen markieren die erhaltenen LOX-Reaktionsprodukte: 1 bedeutet ein TL-Derivat, enthaltend eine oxygenierte Fettsäure; 2 bedeutet ein doppelt oxygeniertes TL-Isomer, und 3 bedeutet ein 3-fach oxygeniertes TL. Zur Analyse der Positionsisomere der LA Reste wurden die freien Fettsäurederivate mittels alkalischer Hydrolyse und anschließender RP-HPLC erhalten. Die Positionsisomere der Hydroxy-Linolsäure (HODE) wurden als molare Verhältnisse dargestellt, wie sie mittels SP-HPLC ermittelt wurden, wie in den eingefügten Abbildungen gezeigt. Optische Isomere wurden mittels CP-HPLC bestimmt.

Verwendete Abkürzungen sind:

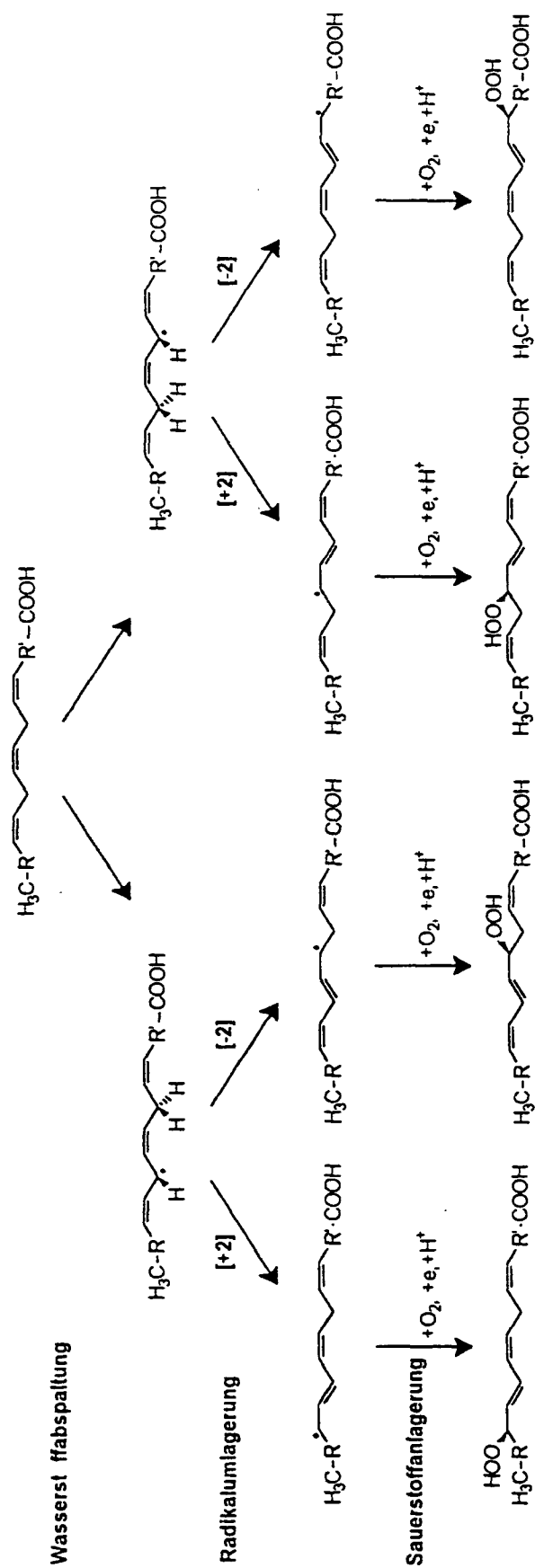
CP-HPLC	für	chirale Phase HPLC;
RP-HPLC	für	Umkehrphasen HPLC;
SP-HPLC	für	Direktphasen HPLC;
HPETE	für	Hydroperoxyarachidonsäure;
13-H(P)ODE	für	(13 S, 9 Z, 11 E)-13-Hydro(pero)xy-9,11-Oktadekadiensäure;
9(HP)ODE	für	(9 S, 10 E, 12 Z)-9-Hydro(pero)xy-10,12-Oktadekadiensäure;
LA	für	Linolsäure;
LOX	für	Lipoxygenase;
TL	für	Trilinolein

Patentansprüche

1. Verfahren zum Herstellen einer pflanzlichen Lipoxxygenase mit veränderter Positionsspezifität, umfassend den Schritt
 - Austauschen einer oder mehrerer Aminosäuren in einer Wildtyp-Lipoxxygenase
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der bzw. die Aminosäureaustausch(e) im Bereich der Aminosäureposition 527 bis 536 und/oder 593 bis 602 der Lipoxxygenase aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxxygenase aus einer anderen Pflanzenart erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 und/oder 597 der Lipoxxygenase aus *Cucumis sativus* oder einer korrespondierenden Position in einer Lipoxxygenase aus einer anderen Pflanze erfolgt.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 zum Vorliegen eines Phe- oder His-Restes und/oder an Position 597 zum Vorliegen eines Val- oder Phe-Restes in der Mutante führt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Austausch an Position 531 ein Val- → Phe- und/oder an Position 597 ein His- → Val-Austausch darstellt.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäureaustausch durch gerichtete Mutagenese herbeigeführt wird.
7. Lipoxxygenase, erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 6.

8. Nukleinsäure, die für eine Lipoxxygenase nach Anspruch 7 kodiert.
9. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 8.
10. Zelle, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 8 und/oder einen Vektor nach Anspruch 9.
11. Pflanze oder Pflanzenteil, umfassend eine Wirtszelle nach Anspruch 10.
12. Verfahren zum Herstellen von 6-, 9- und/oder 6, 9-Hydroperoxy- γ -Linolensäure, umfassend den Schritt
 - Umsetzen von γ -Linolensäure mit einer Lipoxxygenase nach Anspruch 7.
13. Verwendung einer Lipoxxygenase nach Anspruch 7 zum Herstellen von 6-, 9- und/oder 6, 9-Hydroperoxy- γ -Linolensäure.
14. γ -Linolensäurederivat, enthaltend eine Hydroperoxygruppe oder eine Hydroxygruppe an Position 6.

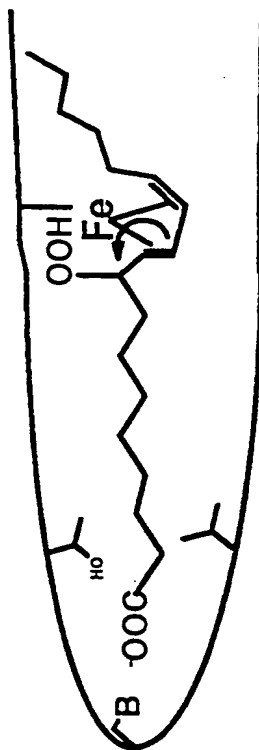
FIG. 1



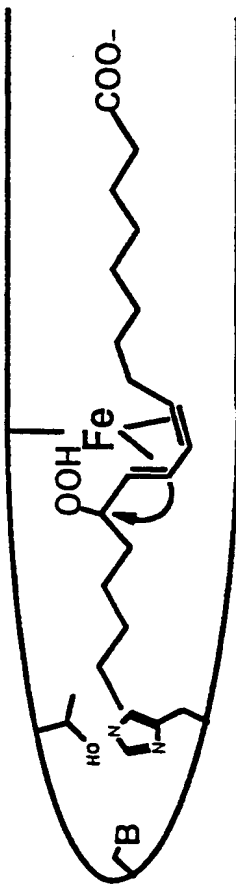
2/7

FIG. 2

9-LOX



13-LOX



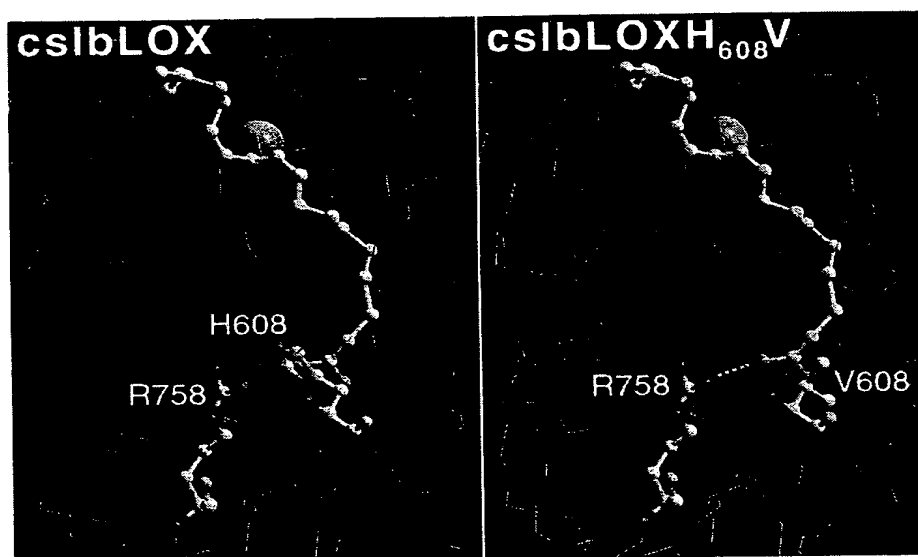
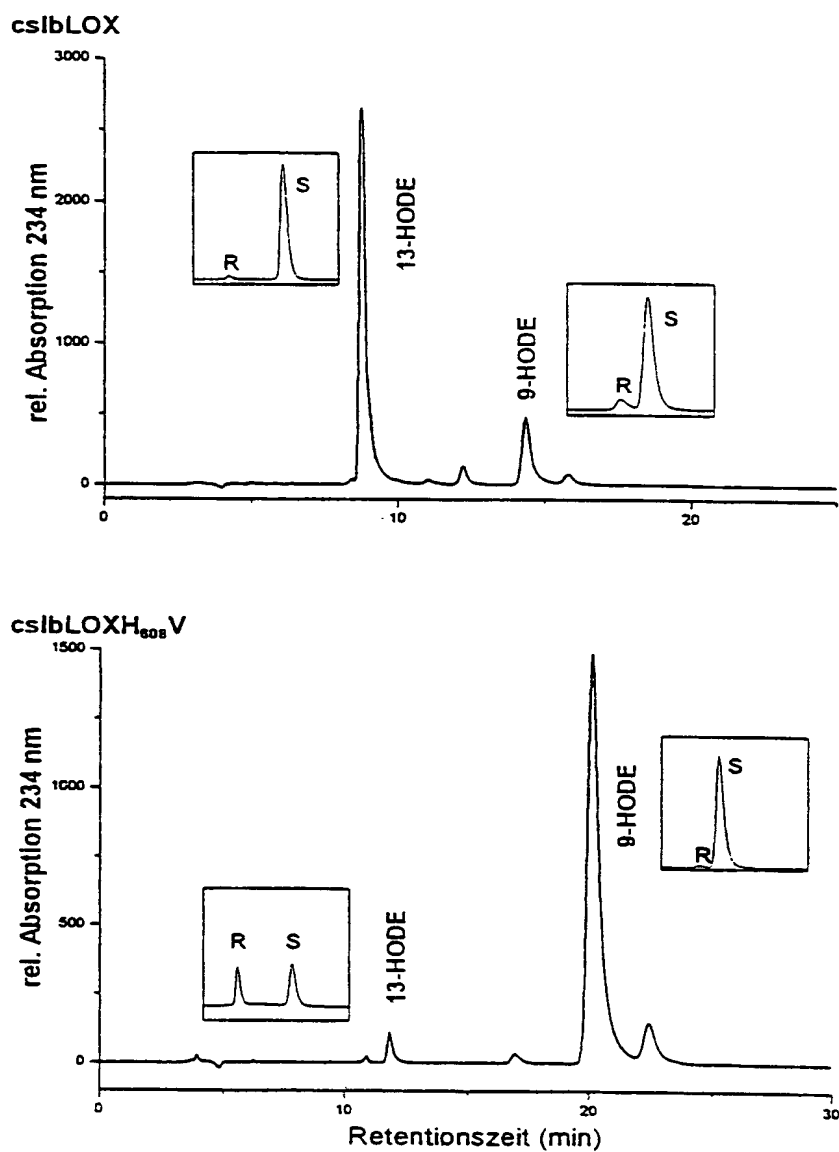


Fig. 3

FIG. 4

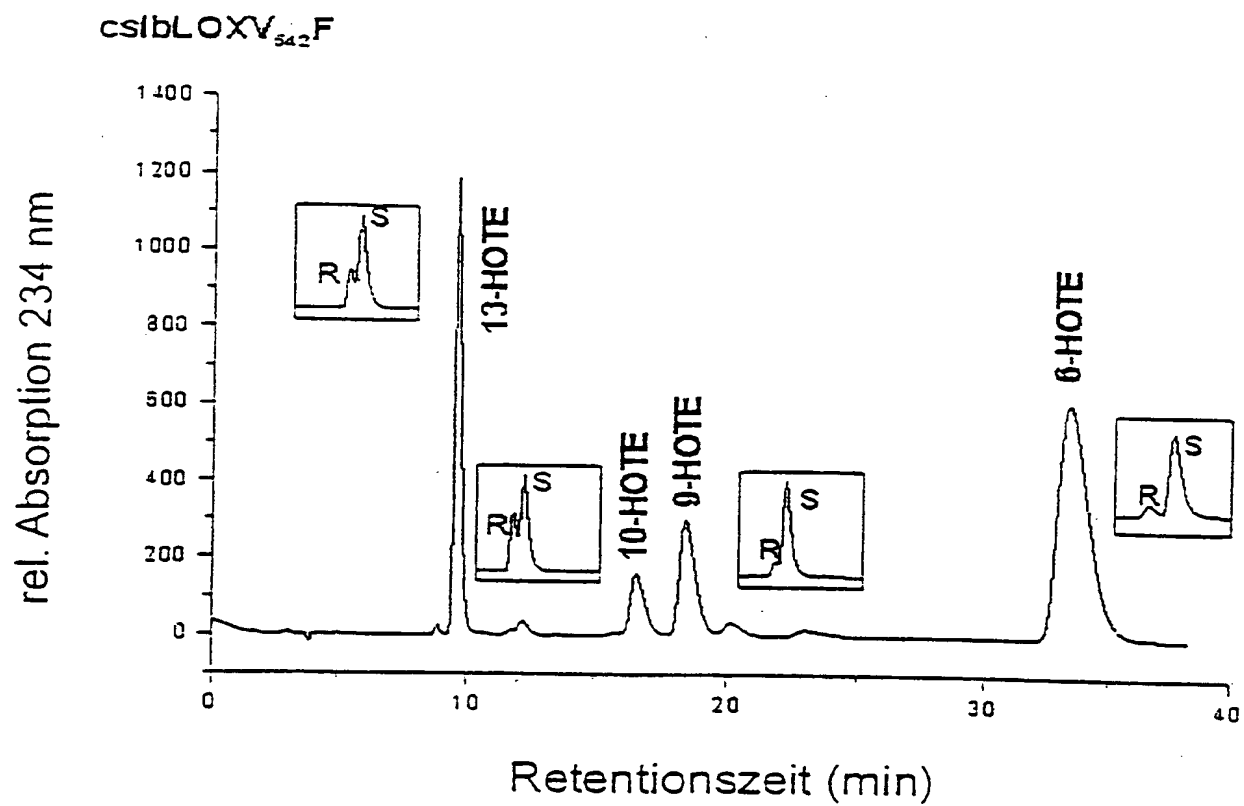


5/7

FIG. 5

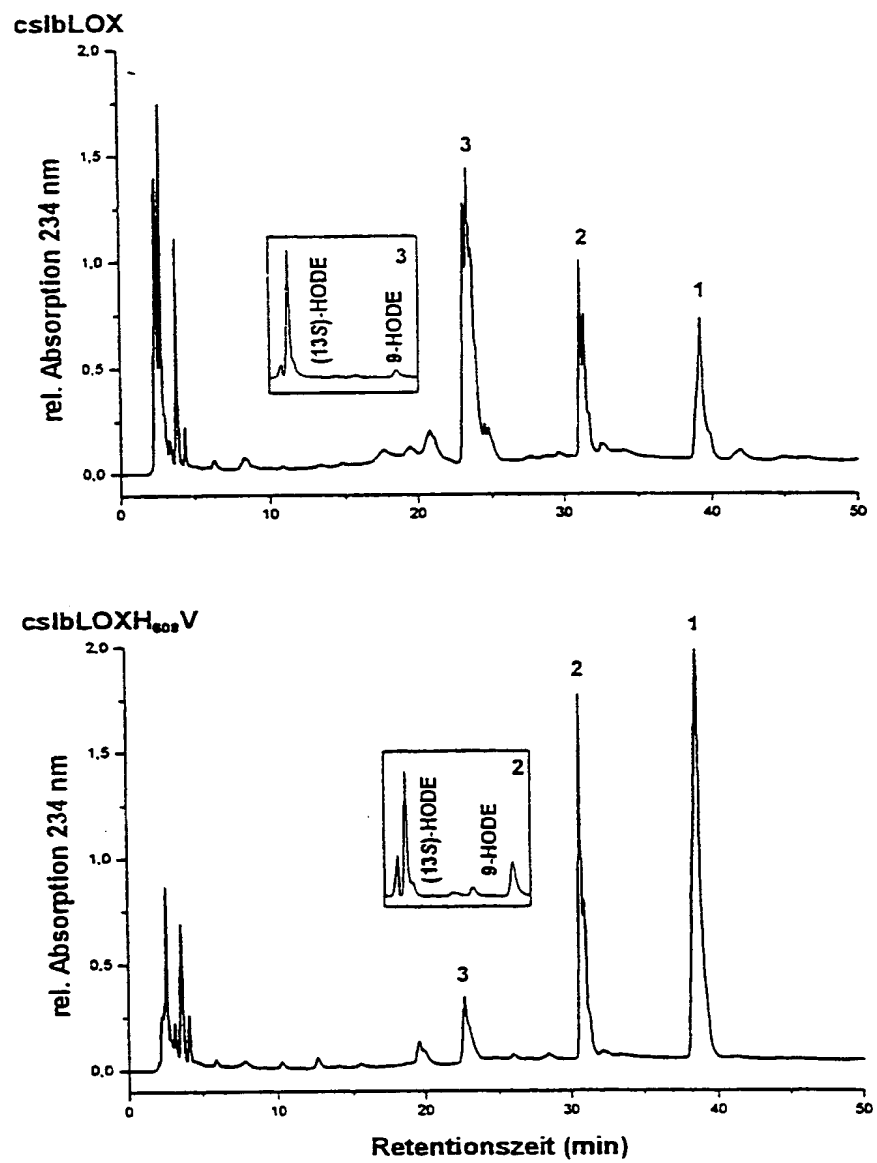
1	MFGIGKNIIE	GALNTTGDLA	GSVINAGGNI	LDRVSSLGGN	KIKGKVILMR	SNVLDFTFEH
61	SNLLDNFTL	LGGGVSFQLI	SATHTSNDSR	GKVGNKAYLE	RWLTSIPPLF	AGESVFQINF
121	QWDENFGFPG	AFFIKNGHTS	EFFLKSLTLD	DVPGYGRVHF	DCNSWVYPSG	RYKKDRIFFA
181	NHVYLPSTP	NPLRKYREEE	LWNLRGDGTG	ERKEWDRIYD	YDVYNDIADP	DVGDRHPILG
241	GTTEYPYPRR	GRTGRPRSRR	DHNYESRLSP	IMSLDIYVPK	DENFGHLKMS	DFLGYTLKAL
301	SISIKPGLQS	IFDVTPNEFD	NFKEVDNLFE	RGFPPIFNAF	KTLTEDLTTP	LFKALVRNDG
361	EKFLKFPTPE	VVKDNKIGWS	TDEEFAREML	AGPNPLLIRR	LEAFPPTSCL	DPNVYGNQNS
421	TITEEHIKHG	LDGLTVDEAM	KQNRLYIVDF	HDALMPYLTR	MNATSTKTYA	TRTLTLLKDD
481	GTLKPLVIEL	ALPHPQGDQL	GAISKLYFPA	ENGVQKSIWQ	LAKAYVTVND	VGYHQLISHW
541	LHTHAVLEPF	VIATHRQLSV	LHPIHKLLVP	HYKDTMFINA	SARQVLINAN	GLIETTHYPS
601	KYSMELSSIL	YKDWTFPDQA	LPNNLMKRGL	AVEDSSAPHG	LRLILNDYPF	AVDGLDIWSA
661	IKTWVQDYCC	LYYKDDNAVQ	NDFELQSWWN	ELREKGHADK	KHEPWWPKMQ	TLSELIESCT
721	TIWIASALH	AAVNFGQYPY	GGYILNRPTT	SRRFMPEVGT	AEYKELESNP	EKAFLRTICS
781	ELQALVSISI	IELSKHASD	EVYLGQRASI	DWTSDKIALE	AFEKFGKNLF	EVENRIMERN
841	KEVNLKNRSG	PVNLPYTLLV	PSSNEGLTGR	GIPNSISI		

FIG. 6



7/7

FIG. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In tional Application No

PCT/EP 00/02545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 A01H5/00 C12N15/82

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C12P A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, PAJ, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>HORNING ELLEN ET AL: "Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 96, no. 7, 30 March 1999 (1999-03-30), pages 4192-4197, XP000915201</p> <p>March 30, 1999</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>the whole document</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 July 2000

Date of mailing of the international search report

04/08/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Espen, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 00/02545

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FEUSSNER IVO ET AL: "All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro." FEBS LETTERS, vol. 431, no. 3, 24 July 1998 (1998-07-24), pages 433-436, XP000915416 ISSN: 0014-5793 the whole document	1,2,7-11
Y	SLOANE D L ET AL: "Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity." PROTEIN ENGINEERING, (1995 MAR) 8 (3) 275-82. , XP000915415 the whole document	1,2,7-11
Y	STECZKO J ET AL: "Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement." BIOCHEMISTRY, (1992 APR 28) 31 (16) 4053-7. , XP000915423 abstract; figure 1	1,2,7-11
Y	PRIGGE S T ET AL: "Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases." PROTEINS, (1996 MAR) 24 (3) 275-91. , XP000924868 abstract	1,2,7-11
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 338 (C-527), 12 September 1988 (1988-09-12) & JP 63 098392 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL;OTHERS: 01), 28 April 1988 (1988-04-28) abstract	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 497 (C-0774), 30 October 1990 (1990-10-30) & JP 02 207792 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL), 17 August 1990 (1990-08-17) abstract	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/02545

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 63098392 A	28-04-1988	JP 1709763 C JP 3070477 B	11-11-1992 07-11-1991
JP 02207792 A	17-08-1990	JP 1731880 C JP 4039996 B	17-02-1993 01-07-1992

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. .tionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02545

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/53 C12N9/02 C12P7/64 A01H5/00 C12N15/82

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C12P A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

BIOSIS, PAJ, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P, X	<p>HORNING ELLEN ET AL: "Conversion of cucumber linoleate 13-lipoxygenase to a 9-lipoxygenating species by site-directed mutagenesis."</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, Bd. 96, Nr. 7, 30. März 1999 (1999-03-30), Seiten 4192-4197, XP000915201</p> <p>March 30, 1999</p> <p>ISSN: 0027-8424</p> <p>das ganze Dokument</p> <p style="text-align: center;">--- -/-</p>	1-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. Juli 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/08/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Espen, J

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 00/02545

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	FEUSSNER IVO ET AL: "All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant His-tagged lipid body lipoxygenase in vitro." FEBS LETTERS, Bd. 431, Nr. 3, 24. Juli 1998 (1998-07-24), Seiten 433-436, XP000915416 ISSN: 0014-5793 das ganze Dokument ---	1,2,7-11
Y	SLOANE D L ET AL: "Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity." PROTEIN ENGINEERING, (1995 MAR) 8 (3) 275-82. , XP000915415 das ganze Dokument ---	1,2,7-11
Y	STECZKO J ET AL: "Conserved histidine residues in soybean lipoxygenase: functional consequences of their replacement." BIOCHEMISTRY, (1992 APR 28) 31 (16) 4053-7. , XP000915423 Zusammenfassung; Abbildung 1 ---	1,2,7-11
Y	PRIGGE S T ET AL: "Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases." PROTEINS, (1996 MAR) 24 (3) 275-91. , XP000924868 Zusammenfassung ---	1,2,7-11
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 012, no. 338 (C-527), 12. September 1988 (1988-09-12) & JP 63 098392 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL; OTHERS: 01), 28. April 1988 (1988-04-28) Zusammenfassung ---	
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 014, no. 497 (C-0774), 30. Oktober 1990 (1990-10-30) & JP 02 207792 A (AGENCY OF IND SCIENCE & TECHNOL), 17. August 1990 (1990-08-17) Zusammenfassung -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. ionalles Aktenzeichen

PCT/EP 00/02545

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
JP 63098392 A	28-04-1988	JP 1709763 C	11-11-1992
		JP 3070477 B	07-11-1991
JP 02207792 A	17-08-1990	JP 1731880 C	17-02-1993
		JP 4039996 B	01-07-1992

Formblatt PCT/ISA/210 (Anhang Patentfamilie)(Juli 1992)



1